



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

PhD

Title:

**The behavioral and electrophysiological effects of cannabinoid receptor
agonism and antagonism on harmaline-induced tremor in rats**

BY:

Hassan Abbassian

Supervisor:

Dr. Mohammad Shabani

Advisors:

- 1- Professor Benjamin Jason Whalley**
- 2- Professor Vahid Sheibani**

Year:

2016



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته علوم اعصاب

عنوان:

بررسی اثرات رفتاری و الکتروفیزیولوژیک آگونیست و آنتاگونیست های گیرنده
کانابینوئید در ترمور ناشی از تجویز هارمالین در موش صحرایی

توسط: حسن عباسیان

استاد راهنما: دکتر محمد شعبانی

استاد مشاور: ۱- دکتر بنجامین جیسون والی، ۲- دکتر وحید شیبانی

سال تحصیلی: ۱۳۹۵-۱۳۹۶

ION	inferior olivary nucleus
HVA	high voltage activation
cm	Centimeter
s	Seconds
Hz	Hertz
mV	Millivolts
ISI	Interspike intervals
dH ₂ O	Distilled water
ip	Intraperitoneal (injection)
nA	Nano Ampere
pA	Pico Ampere

Abstract

Background and Objectives:

The cerebellum has been extensively studied for its role in movement. Also it is appropriate to say that the cerebellum has a modulatory role in cognitions. It is active during various types of movement, but it also plays a role in regulating and timing of movement. Its overall functions have yet to be defined. Its role in the Essential tremor one of the worldwide debilitating disorder has led to an increase studies on pharmacological agents. The cannabinoid receptors (CBR) are the most abundant G-protein coupled receptors in the mammalian brain with the highest densities within the cerebellum. In the wake of anecdotal, largely uncontrolled, observations claiming the amelioration of some symptoms among cannabis smokers, and the high density of cannabinoid receptors in the areas responsible for motor function, including basal ganglia and cerebellum, many researchers have pursued the question of whether cannabinoid-based compounds could be used therapeutically to alleviate tremor associated with central nervous system diseases. Cannabinoid receptors manipulations have been reported to cause altering the

XVIII

cerebellar dependent activities. This study was performed to contribute to knowledge pertaining to the some cannabinoid receptor agonist and antagonists on tremor induced by Harmaline, a neurotoxic beta carboline derivative.

Methods and Materials:

To test the role of the cannabinoid receptor on essential tremor we organized two sets of tests on Rats (4 week in age and 40-60 g in weight), Behavioral and Electrophysiological.

Behavioral tests organized in two different design, one in aim of locomotor assessment and the other designed for assessing mixed locomotor and cognition disturbances and anxiety-like behaviors.

Experimental groups were includes:

1. Control (dH₂O 0.5 ml), 2. Harmaline (30mg/kg), 3. Agonist (WIN55, 212-2 1mg/kg) with Harmaline (30mg/kg), and 4. Antagonists (AM251 1mg/kg or Rimonabant 10mg/kg) with Harmaline (30mg/kg).

For the electrophysiology the alive purkinje cells underwent the whole cell patch clamp technique in-vitro to acquire the cell electrophysiological properties. In this section three discrete experiments were designed. Experiment 1 for spontaneous activity of purkinje cells. Experiment 2 assessed the positive evoked responses and Experiment 3 assessed the negative evoked responses.

Results:

Harmaline induced a significant and persistent tremor that affected all body parts demonstrating that 30mg kg⁻¹ harmaline treatment induces severe tremor associated with significant functional deficits that can be detected and assessed using the tasks employed. Also harmaline causes significant reduction in number of rearing and grooming events, total distance moved, mobility

duration and median speed in the open field test. Median time durations on the rod and median gripping time in the grip strength test was decreased by harmaline. There are an increased in mean gait width and decreasing in gait length. We show in this study that, the Cannabinoid receptor 1 agonist causes worsening the effects of harmaline behavioral difficulties. On the other hand the antagonists reverses these effects. Whole-cell somatic patch clamp recordings were made from cerebellar slices of male rats that were exposed to harmaline. Harmaline exposure induced sever alterations in the spontaneous and evoked firing behavior of purkinje neurons in male rats as evidenced by a significant decrease in the mean number of spikes, half width and instantaneous frequency. WIN55, 212-2 largely exacerbated harmaline-induced symptoms as demonstrated by reduced AHP, Half width, action potential amplitude and increased event frequency and instantaneous frequency. In the whole cell patch, effects of harmaline in frequency and firing regularity were reversed by administration of Rimonabant and WIN55, 212-2 significantly.

Conclusion:

The results of this study show that the cannabinoid receptor 1 antagonist can consider as therapeutic agents in tremor induced by harmaline. Since harmaline mimicked the Essential tremor, we need further investigations to clearing the benefits or possible harmfulness of using these agents in human.

Keywords: Harmaline, Essential Tremor, Cannabinoid Receptor, Whole Cell Recording

چکیده:

مقدمه و اهداف:

نقش مخچه در ترمور که یکی از اختلالات ناتوان کننده در سراسر جهان است، باعث افزایش مطالعات روی عوامل دارویی

موثر در این مورد شده است. گیرنده های کانابینوئید (CBR) با بالاترین تراکم در درون مخچه دیده می شوند.

گزارش شده که دستکاری گیرنده های کانابینوئید باعث تغییر فعالیت های وابسته به مخچه می گردد. با توجه به تراکم

بالای گیرنده ها در مخچه، این سوال مطرح است که آیا کانابینوئیدها می توانند به عنوان عامل درمانی برای کاهش

ترمور مرتبط با بیماری های سیستم عصبی مرکزی مد نظر قرار گیرند؟

لذا این مطالعه با هدف کمک به ارتقاء دانش مربوط به اثر آگونیست ها و آنتاگونیست های گیرنده کانابینوئید در ترمور

ناشی از هارمالین، انجام شده است.

روش ها:

دو مجموعه آزمایش بر روی موش های ۴ هفته ای (۶۰-۴۰ گرم) طراحی شد. آزمون رفتاری در دو جنبه مختلف، یکی

در جهت ارزیابی حرکتی شامل آزمون جعبه باز، روتارود، وایر گریپ و اندازه گیری طول و عرض قدم و دیگری برای

ارزیابی همزمان اثرات حرکتی و شناختی و اضطراب شامل آزمونهای ذکر شده بعلاوه آزمون شاتل باکس سازمان بندی

شدند. گروه های مورد مطالعه عبارت بودند از:

۱- گروه کنترل سالین، ۲- گروه هارمالین جهت ایجاد ترمور، ۳- گروههای آگونیست (WIN) با سه دوز به همراه تجویز

هارمالین ۴- گروههای آنتاگونیست AM251 و Rimonabant به همراه هارمالین.

در الکتروفیزیولوژی ثبت داخل سلولی، سه آزمایش مجزا طراحی شد. آزمایش اول برای فعالیتهای خود به خودی سلولهای پورکنز و آزمایش دوم ارزیابی پاسخ برانگیخته با تحریکات مثبت و آزمایش سوم برای ارزیابی پاسخ برانگیخته با تحریکات منفی.

یافته ها:

تجویز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم هارمالین باعث ترمور شدید شد که با نقص های عملکردی قابل توجه همراه بود. هارمالین کاهش قابل توجهی در پارامتر های آزمون جعبه باز از جمله سرعت حرکت و مقدار و مدت زمان تحرک ایجاد کرد. متوسط زمان ماندن بر روی میله روتارود و زمان تحمل در تست وایر گریپ با تجویز هارمالین کاهش یافت. در آزمایش Foot print عرض قدم افزایش و طول قدم کاهش پیدا کرد.

ما در این مطالعه نشان دادیم که، آگونیست CB1 باعث وخیم تر شدن مشکلات رفتاری ناشی از تجویز هارمالین شد. از سوی دیگر آنتاگونیست های آن باعث معکوس شدن اثر هارمالین شدند. در تست های الکتروفیزیولوژی، قرار گرفتن در معرض هارمالین تغییرات شدیدی در فعالیت خود به خودی و برانگیخته سلول های عصبی پورکنز ایجاد کرد. کاهش قابل توجهی در تعداد متوسط پالس ها و طول مدت پتانسیل عمل و فرکانس لحظه ای بدنبال تجویز هارمالین اتفاق افتاد. تجویز آگونیست گیرنده کانابینویدی باعث تشدید علائم هارمالین شد. در کل، اثرات هارمالین در فرکانس و نظم شلیک توسط ریمونابانت و AM251 به طور قابل توجهی معکوس شد.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان می دهد که آنتاگونیستهای گیرنده کانابینوئید شماره یک می توانند به عنوان عوامل درمانی در ترمور ناشی از هارمالین در نظر گرفته شوند. از آنجا که هارمالین فقط باعث تقلید ترمور اولیه می شود، تحقیقات بیشتری برای روشن شدن مزایا یا ضررهای احتمالی استفاده از این عوامل در انسان مورد نیاز می باشد.

کلید واژه ها: هارمالین، ترمور، رسپتور کانابینوئید، ثبت داخل سلولی